

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-229948

(43)公開日 平成5年(1993)9月7日

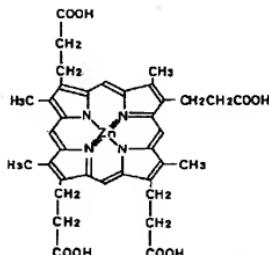
(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F 1	技術表示箇所
A 61 K 31/555	A D U	7252-4C		
35/74	G	7431-4C		
C 12 P 17/18	B	8931-4B		
// C 07 D 487/22		7019-4C		
(C 12 P 17/18				

審査請求 未請求 請求項の数4(全14頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-150980	(71)出願人	00022261 東洋酸造株式会社 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1
(22)出願日	平成4年(1992)6月10日	(72)発明者	島屋 実 静岡県田方郡大仁町三福854-1
(31)優先権主張番号	特願平3-343670	(72)発明者	柳沼 慧 静岡県田方郡伊山町1005-6
(32)優先日	平3(1991)12月25日	(72)発明者	松本 一彦 静岡県田方郡函南町上沢955-500
(33)優先権主張国	日本(JP)	(72)発明者	松浦 一男 静岡県田方郡伊山町1005-5
		(74)代理人	弁理士 小林 和憲

(54)【発明の名称】 悪性腫瘍の治療剤または診断剤およびAC8007物質の製造法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 AC8007物質またはその非毒性塩を含む  
悪性腫瘍の治療剤、診断剤の提供。【構成】 以下の理化学的性質を有するAC8007物  
質またはその非毒性塩を含む医薬。(1)元素分析値: C: 約60%、H: 5%、N: 約8  
%、Zn: 約8~10%(2)質量分析値: 717 (MH<sup>+</sup>、FAB-MSによ  
る)(3)分子式: C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub>Zn  
AC8007物質は下記推定構造式を有し、アースロバクター属に属するAC8007物質生産菌を  
培地に培養し、培養物よりAC8007特質を採取する  
ことにより製造する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の理化学的性質を有するAC8000  
7物質またはその非毒性塩を有効成分とする特徴  
とする悪性腫瘍の治療剤または診断剤。

## (1) 元素分析値

C: 約6.0%、H: 約5%、N: 約8%、Zn: 約8~  
1.0%

## (2) 質量分析値

71.7 (MH<sup>+</sup>、FAB-MSによる)

## (3) 分子式

\* C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub>Zn

(4) 可視部吸収スペクトル

## 【化1】

メタノール  
入 max nm (E 1% 1cm):

少なくとも386(肩) (750)、406 (352)  
5、538 (185)、574 (190) nm付近に  
特徴的な吸収を有する

## 【化2】

\* 10

0.1 NHCl + メタノール nm (E 1% 1cm):  
入 max

少なくとも386(肩) (1275)、402 (469)  
0、560 (175)、591 (60) nm付近に特  
徴的な吸収を有する

## (5) 赤外線吸収スペクトル (KBr法)

少なくとも3420、2920、1705、1400、  
1275、1130、940、835 cm<sup>-1</sup>付近に特徴的  
な吸収を有する

## (6) 溶剤に対する溶解性

メタノール、酢酸エチル、酢酸、ジメチルスルホキシド  
に可溶性、水、ヘキサン、ベンゼンに不溶性

## (7) 星色反応

過マンガン酸カリウム反応、ヨード反応は陽性、塩化第  
二鉄反応、ドライゲンドルフ反応、ニンヒドリン反応は  
陰性

## (8) 塩基性、酸性、中性の差別

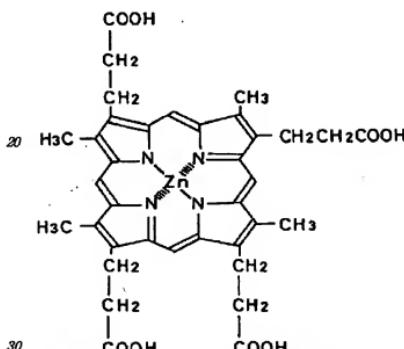
## 酸性物質

## (9) 物質の色

暗赤色

【請求項2】 AC8000物質が下記の推定化学構造式を有することを特徴とする請求項1記載の悪性腫瘍の治療剤または診断剤。

## 【化3】



【請求項3】 アースロバクター属に属するAC8000  
7物質生産菌を培地に培養し、次いで培養物よりAC8  
007物質を採取することを特徴とするAC8000物  
質の製造法。

【請求項4】 アースロバクター属に属するAC8000  
7物質生産菌が、アースロバクター・エスピード・TM-  
1 (FERM BP-3676) である請求項3記載の  
製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、AC8000物質また  
はその非毒性塩を有効成分とする悪性腫瘍の治療剤また  
は診断剤およびAC8000物質の製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 悪性腫瘍への光化学療法 (Photodynamic therapy: PDT) が開発されて  
数十年を経過し、多数の有効例が確認され、早期悪性腫  
瘍の根治治療あるいは診断剤として使用されている。こ  
のPDTに使用される代表的光増感剤はポルフィリン誘  
導体である。

【0003】しかしながら、ポルフィリン誘導体は次のような欠点がある。(1) 化学的に単一でない、(2) 組織透過性の良い長波領域に吸収を持たない、(3) 腫瘍組織に長く保持されない、(4) 正常細胞からの排泄が遅い、(5) 光化学反応量収率が低いなどがあげられる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】以上のような問題を一点でも解決できる光増感剤の開発は、将来のPDTに有効であると期待される。そして、副作用の少ない新規かつ有用な光増感剤が悪性腫瘍治療のために求められている。本発明の目的は、AC8007物質またはその非毒性塩を有効成分とする悪性腫瘍の治療剤または診断剤およびAC8007物質の製造法を提供するにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】これまでのPDTにおける光増感剤は、すべて化学的に合成された物質であり、副作用の面で問題があつた。本発明者は微生物が生産する天然の生理活性物質の内から、アースラバスター・エスピ・TM-1(微生物研究会第3676号)の培養濁液からAC8007物質(特開平2-234688号公報参照)と同定される物質を探取し、本物質が亜鉛を有する物質であることを見出した。更に、本発明者は、本物質が悪性腫瘍のPDTの光感剤としての性質を\*

0.1N HCl・メタノール  
入 max nm (E 1%):

少なくとも386(肩) (1275)、402(4690)、560(175)、591(60) nm付近に特徴的な吸収を有する。

【0009】(5) 赤外線吸収スペクトル(KBr法):図3

少なくとも3420、2920、1705、1400、1275、1130、940、835cm<sup>-1</sup>付近に特徴的な吸収を有する。

(6) 溶剤に対する溶解性

メタノール、酢酸エチル、酢酸、ジメチルスルホキシドに可溶性、水、ヘキサン、ベンゼンに不溶性

【0010】(7) 显色反応

過マンガン酸カリウム反応、ヨード反応は陽性、塩化第二鉄反応、ドーラーゲンルルフ反応、ニンヒドリン反応は陰性

(8) 塩基性、酸性、中性の区分

酸性物質

(9) 物質の色

暗赤色

(10) <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, 27°C, d<sub>6</sub> DMSO中で測定):図4

【0011】(11) <sup>13</sup>C-NMR (100MHz, 27°C, DMSO中で測定):少なくとも下記に示したシ 50

\*有する治療剤として、又、診断剤として有用であることを見出し、さらに、AC8007物質の良好な製造法を見出し、本発明を完成した。

【0006】本発明の有効物質であるAC8007物質は、少なくとも次に示すような理化学的性質を有する。

(1) 元素分析

C: 約60%、H: 約5%、N: 約8%、Zn: 約8~10%

10 (2) 質量分析 717 (MH<sup>+</sup>, FAB-MS) による

(3) 分子式

C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Zn

(4) 可視部吸収スペクトル: 図1(中性条件)、図2(酸性条件)

【0007】

【化4】

メタノール  
入 max nm (E 1%):

少なくとも386(肩) (750)、406(3522)、538(185)、574(190) nm付近に特徴的な吸収を有する

【0008】

【化5】

0.1N HCl・メタノール  
入 max nm (E 1%):

50 グナルが認められた。174.20(s)、147.62(s)、147.54(s)、146.83(s)、146.77(s)、146.73(s)、139.44(s)、139.30(s)、136.65(s)、136.54(s)、97.06(d)、96.95(d)、37.41(t)、21.63(t)、21.59(t)、11.46(q)

【0012】(12) 薄層クロマトグラフ(東京化成社製、スポットツイルムシリカゲルf使用)

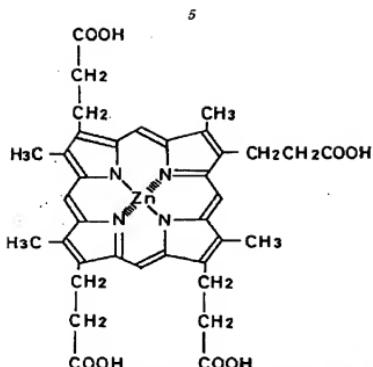
Rf = 0.45 [展開溶媒: クロロホルム-メタノール酢酸(10:1, 5:0, 1)]

Rf = 0.37 [展開溶媒: プタノール-エタノール-クロロホルム-アンモニア水(4:5:2:4)]

【0013】AC8007物質は、以上の性質を有することから、次式で表される構造であると推定される。

【0014】

【化6】



〔0015〕本発明の有効成分であるAC8007物質を生産するには、微生物の培養による醸酵法が最も適切である。生産に好適な微生物としては、アースロバクター・エスピ- TM-1 (*Arthrobacter s.* sp. TM-1: 種工研条寄第3676号) を挙げることができる。本菌は、滋賀県甲賀市甲賀町の白菜畑の土壤より分離した細菌TM-1株であり、本発明に最も有効に使用される菌株の一例であって、本菌株の菌学的性質を示すと次の通りである。

【0016】尚、本菌株の同定に当たって、同定試験は「医学細菌同定の手引き、第2版、1974」や、「Microbiological Methods 3卷」等に準じて実施した。実験結果を、「医学細菌同定

## 5. 生理·化学的性状

グラム染色	+
KOH反応	-
抗酸性染色	-
カプセル形成	-

[0030]

OFテスト (Hugh-Leifson)	NT
OFテスト (N源にNH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> , PO <sub>4</sub> )	O
好気での生育	+
嫌気での生育	+
生育温度範囲 42°C	-
37°C	+
20°C	+
10°C	NT

[0031]

食塩耐性	0 %	+
	0. 5 %	+
	3. 0 %	NT
	5. 0 %	NT
生育期	4. 7	-

の手引き、第2版、1974)「Bergery's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (1984)、Vol. 2 (1986)、Vol. 3 (1989)」等に対比して同定した。培養温度は28～30°Cで行った。(+:陽性、(-):弱陽性、△:陰性、NT:未試験、ND:文献に記載がない、NC:変化しない)

### 【0017】實驗結果

## 1. 生育の特徴

10 普通寒天斜面培地  
周辺はギザギザ状の丸い集落を形成し、中央が凸状に盛り上がる。半透明、温潤で灰白色～淡黄土色を呈するが、可溶性色素は産生しない。

普通寒天平面培地  
生育は、悪いが線状に生育する。半透明、湿润で灰白色  
～淡黄土色を呈するが、可溶性色素は産生しない。

液体培地 (ペプトン水)  
特に温湿度

一様に混濁する。

リトモスマイルク塔地

## 20 アルカリになりペプトン化する。

[0]

NT

3. 三

NT

4. 形態の特徴  
培養前期には長桿状を示し、弯曲し、大きさは 0.8 × 4 ~ 5  $\mu\text{m}$  で V 字状を示すものもある。培養後期には 1 ~ 2  $\mu\text{m}$  で球形の短桿状、球形に変化する細胞

1. 2 x 1.

7

5. 6  
9. 0  
10. 0

8

+  
+  
-

[0022]

ゲラチン分解	-
デンプン分解	-
カゼイン分解	+
エスクリン分解	NT
セルロース分解	-
チロシン分解	NT
Tween 80 分解	NT
アルギニン分解	NT
カタラーゼ産生	-
オキシダーゼ産生	NT

[0023]

レシチナーゼ産生	-
ウレアーゼ産生 (SSR)	NT
ウレアーゼ産生 (Chrys.)	NT
インドール産生	-
硫化水素産生 (lead acetate paper)	+
アセトイソ産生 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	-
アセトイソ産生 (NaCl)	-
M.R. テスト	-
硝酸塩還元テスト (ガス産生)	-
(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> の検出)	-
(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> の検出)	+

[0024]

シモンズ培地での利用性 (アルカリ産生)	
クエン酸塩	-
リンゴ酸塩	+
マレイン酸塩	-
マロン酸塩	-
プロピオン酸塩	-
グルコン酸塩	(+)
コハク酸塩	+

[0025]

クリステンゼン培地での利用性 (アルカリ産生)	
クエン酸塩	+
リンゴ酸塩	+
マレイン酸塩	+
マロン酸塩	+
プロピオン酸塩	+
グルコン酸塩	+

[0026]

コハク酸塩	+
グルコースよりガスの産生	-
糖より酸の産生 (窒素源に NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
アドニトール	-
L (+) -アラビノース	-
セロビオース	-

	9	10
【0027】	ズルシトール メリーエリスリトール フラクトース	— — +
【0028】	D-ガラクトース D-グルコース グリセリン イノシトール イヌリン ラクトース マルトース マンニトール	— + + — — — — —
【0029】	マンノース メレジトース メリビオース ラフィノース L (+) -ラムノース D-リボース サリシン L-セルロース ソルビトール	— — — — — — — — —
【0030】	6. その他の分析 (化学分析等)	— + (+) +
本菌株TM-1の主性状	グラム陽性菌の細菌で短時間培養では桿状を示し、定期的細胞は球状～短桿状になる。また、V、Y字形の細胞も観られる。運動性なし。カタラーゼ非産生、グルコースを酸化的に分解し、酸を産生する。	30
【0031】本菌株TM-1の同定	グラム陽性の細菌で桿状細胞から球状細胞に変化し、V、Y字形(概分枝)等の配列を示す菌属は、Coryneform群のArthrobacter属がある。本菌株の主性状から判断しArthrobacter属に属するものと判断した(他のCoryneform群も検索したが該当する菌属の記載はなかった)。	30
【0032】本菌株TM-1の特性とArthrobacter属の各菌種の諸性状を対比した結果A. simplexが糖よりの酸産生パターンは似ているが、澱粉の分解能、カタラーゼ産生能及びリトモスミルク培地での生育の特徴が、一致しなかった。よって、本菌株をアースロバクター・エスピ- TM-1 (Arthrobacter s. p. TM-1) と同定命名した。本菌、アースロバクター・エスピ- (Arthrobacter s. p.) TM-1株は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した(微生物研究会第3676号、FER 50	M BP-3676)。	40
【0033】本発明の有効成物AC8007物質を得るには、まず、上記の微生物またはAC8007物質を採取し得る量でAC8007物質を生産し得る能力を有する変異株又は変種を常法にしたがつて培地中で好気的に培養する。本発明で示す培地としては、上記アースロバクター属に属するAC8007物質生産菌を、イオウ交換純水11 あたり、イソプロピルアルコール10 ml、酵母エキス0.3 g、ペプトン3.0 g、硝酸アンモニウム3.0 g、リン酸カリウム0.4 g、リン酸二ナトリウム1.5 g、硫酸マグネシウム0.5 g、硫酸マングン1.0 mg、硫酸亜鉛1.0 mg、硝酸銅5.0 μg、三酸化モリブデン1.0 μg、炭酸カルシウム5.0 gを含有する殺菌した培地100mlを収容した500ml容三角フラスコに植菌して、30℃で3日間振とう培養すればよい。この培養物を、上記同様の培地100mlを含む500ml容三角フラスコに、1ml植菌して、30℃で5日間振とう培養すればよい。	40	
【0034】このようにして得られた培養物からAC8007物質を採取するには、AC8007物質が主に培養液中に存在するため、例えば培養物を濾過し、その濾液中に非水溶性有機溶媒、たとえば酢酸エチル、ブタノール、酢酸ブチルなどを加え、酸性pHにて抽出し、次	50	

いでアルカリpHで水に転溶し、さらに酸性pHで溶媒抽出すればよい。これをさらに、シリカゲル、アルミナ、合成吸着剤などによるクロマトグラフィーに付して、分離生成するか、また、高速液体クロマトグラフィーなどを用いて分離取得することもできる。また、得られたAC 8007物質は、公知の方法によりナトリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、公知の非毒性有機アミンとの塩などの塩とすることもできる。このようにして得られたAC 8007物質は、前記したような理化的性質を有する。本発明のAC 8007物質は、以下に示す作用を有する。

## 【0035】(1) 抗腫瘍作用

## 1) Sarcoma-180に対する光増感治療効果

一群5匹のICRマウス20g(雄)の背部一ヶ所にsarcoma-180(1×10<sup>6</sup> cells/ml)を0.05ml皮内接種した。2日後にAC 8007物質、ヘマトポルフィリン(HpD; シグマ社製)をそれぞれ1.5mgを3mlの0.1mMトリス塩酸緩衝液(pH 7. \*

\* 4) を加えた生理食塩水に溶解し、0.2mlをマウス腹腔内に投与した。

【0036】10分後にペントバルビタール麻酔を行い、さらに10分後にハロゲンランプ(JR15V150WB)を使用したルミナースル-150S(林時計製)により光照射を10分間、腫瘍部位に熱が伝わらないように行つた。3日目から腫瘍の長径と短径を測定し、以下の式に基き計算した値を腫瘍の大きさとした。

$$\text{長い径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}$$

$$\text{腫瘍の大きさ} = \frac{\text{長い径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}}{2}$$

## 結果

AC 8007物質は、50mg/kg腹腔内投与後、20分に光を照射することにより表1および図5に示すとおり著名なsarcoma-180の増殖を抑制した。

## 【0037】

## 【表1】

	腫瘍の大きさ (mm)						
	日数 (日)	3	4	5	6	7	8
対 照	非照射	20.1	26.0	35.6	48.3	56.3	52.9
	照射	21.5	27.0	36.0	48.0	58.2	58.1
AC 8007物質 50mg/kg	非照射	21.1	28.2	38.1	46.6	57.6	58.1
	照射	21.3	10.6	14.6	17.3	23.9	23.7
ヘマトポルフィ リン50mg/kg	非照射	21.0	26.6	37.1	45.6	53.0	53.0
	照射	20.6	17.6	23.3	31.9	60.0	45.5

【0038】2) Sarcoma-180に対する作用  
上記1)と同様の方法で、ICRマウスを1群3匹使用した。AC 8007物質、ヘマトポルフィリンジハイドロクロライド(NO. H-1875、純度約75%、シグマ社製)、ヘマトポルフィリン(NO. H-5518、純度約50%、シグマ社製)を、それぞれ2.5mg/kg、1.2.5mg/kg、6.3mg/kgとなるよう5mg/2ml、2.5mg/2ml、1.2.5mg/2ml溶液を0.1M

トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)を加えた生理食塩水で調製した。この混合溶液0.2mlをマウスの腹腔内に投与し、治療効果を検べた。結果は、表2および図6に示すとおり、AC 8007物質は、対照薬として使用したヘマトポルフィリンおよびヘマトポルフィリン2・HC1よりも効果が優れていることが確認された。

## 【0039】

## 【表2】

いでアルカリpHで水に転溶し、さらに酸性pHで溶媒抽出すればよい。これをさらに、シリカゲル、アルミナ、合成吸着剤などによるクロマトグラフィーに付して、分離生成するか、また、高速液体クロマトグラフィーなどを用いて分離取得することもできる。また、得られたAC8007物質は、公知の方法によりナトリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、公知の非毒性有機アミンとの塩などの塩とすることもできる。このようにして得られたAC8007物質は、前記したような理化学的性質を有する。本発明のAC8007物質は、以下に示す作用を有する。

【0035】(1) 抗腫瘍作用

1) Sarcoma-180に対する光増感治療効果

一群5匹のICRマウス20g(雄)の背部一ヶ所にsarcoma-180(1×10<sup>6</sup> cells/ml)を0.05ml皮内接種した。2日後にAC8007物質、ヘマトポルフィリン(HpD; シグマ社製)をそれぞれ1.5mgを3mlの0.1mMトリス塩酸緩衝液(pH 7. \* 10

\* 4) を加えた生理食塩水に溶解し、0.2mlをマウス腹腔内に投与した。

【0036】10分後にペントバルビタール麻酔を行い、さらに10分後にハロゲンランプ(JR15V150WB)を使用したルミナエースL-150S(林時計製)により光照射を10分間、腫瘍部位に熱が伝わらないように行つた。3日目から腫瘍の長径と短径を測定し、以下の式に基き計算した値を腫瘍の大きさとした。

$$\text{腫瘍の大きさ} = \frac{\text{長い径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}}{2}$$

結果

AC8007物質は、50mg/kg腹腔内投与後、20分に光を照射することにより表1および図5に示すとおり著名なsarcoma-180の増殖を抑制した。

【0037】

【表1】

	腫瘍の大きさ (mm)						
	日数 (日)	3	4	5	6	7	8
対照	非照射	20.1	26.0	35.6	48.3	56.3	52.9
	照射	21.5	27.0	36.0	48.0	58.2	58.1
AC8007物質 50mg/kg	非照射	21.1	28.2	38.1	46.6	57.6	58.1
	照射	21.3	10.6	14.6	17.3	23.9	23.7
ヘマトポルフィ リン50mg/kg	非照射	21.0	26.6	37.1	45.6	53.0	53.0
	照射	20.6	17.6	23.3	31.9	60.0	45.5

【0038】2) Sarcoma-180に対する作用  
上記1)と同様の方法で、ICRマウスを1群3匹使用した。AC8007物質、ヘマトポルフィリンジハイドロクロライド(NO. H-1875、純度約75%、シグマ社製)、ヘマトポルフィリン(NO. H-5518、純度約50%、シグマ社製)を、それぞれ2.5mg/kg、1.2.5mg/kg、6.3mg/kgとなるよう5mg/2ml、2.5mg/2ml、1.2.5mg/2ml溶液を0.1M

トリス塩酸緩衝液(pH 7. 4)を加えた生理食塩水で調製した。この混合溶液0.2mlをマウスの腹腔内に投与し、治療効果を検べた。結果は、表2および図6に示すとおりで、AC8007物質は、対照薬として使用したヘマトポルフィリンおよびヘマトポルフィリン+HC1よりも効果が優れていることが確認された。

【0039】

【表2】

投与量 (mg/kg)	日 数	腫瘍の大きさ (mm <sup>2</sup> )				
		3	4	5	6	7
		対照	0	18.7	22.7	34.1
AC800 7物質	25		7.8	10.5	14.5	17.6
	12.5		11.3	14.4	21.0	23.7
	6.3		19.3	20.9	30.9	34.4
ヘマトポル フイリン 2HCl	25	12.0	12.8	15.3	24.2	25.1
	12.5		12.9	16.3	25.6	32.0
	6.3		17.4	24.6	35.9	35.8
ヘマトポル フイリン	25		9.7	12.5	20.8	20.0
	12.5		16.1	18.0	28.4	28.9
	6.3		18.1	20.7	39.0	36.7

## 【0040】(2) 腫瘍診断への応用

ICRマウスの背部一ヶ所にSarcoma-180 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) を0.05ml皮内接種した。2日後にAC8007物質50mg/kg投与し、光ガイドを通じて照射すると、腫瘍は激光により局所決定ができる。

## 【0041】(3) 抗腫瘍作用

1) B-16メラノーマに対する光増感治療効果

一群3匹のBDF1: マウス20g(雄)の背部一ヶ所にB-16メラノーマ ( $2 \times 10^7$  cells/ml) を0.05ml皮内接種した。7日後にAC8007物質、ヘマトポルフイリン(HpD; シグマ社製)をそれぞれ50mg/kg、25mg/kg、12.5mg/kgとなるように1.0mg/2ml、5mg/2ml、2.5mg/2ml溶液を0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加えた生理食塩水に溶解し、0.2mlをマウス腹腔内に投与した。10分後にベントバルビタール麻酔を行い、さらに10分後に

ハロゲンランプ (J R 15V 150WB) を使用したルミナースL-150S(林時計製)により光照射を10分間、腫瘍部位に熱が伝わらないよう行った。8日目から腫瘍の長径と短径を測定し、以下の式に基き計算した値を腫瘍の大きさとした。

$$\text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}$$

腫瘍の大きさ =

2

## 30 【0042】結果

AC8007物質は、50mg/kg、25mg/kg腹腔内投与後、20分に光を照射することにより表3および図8に示すとおり著名なB-16メラノーマの増殖を抑制し、HpDの光照射による光増感治療は表3および図9に示した。

【0043】

【表3】

投与量 (mg/kg)	日 数	腫瘍の大きさ (mm <sup>2</sup> )					
		7	8	9	10	11	12
		対照	0	11.9	15.9	22.6	27.04
AC 800 7物質	50	11.7	6.9	13.1	14.4	18.2	20.2
	25	11.5	10.9	14.2	19.8	23.1	30.9
	12.5	11.0	12.2	17.4	21.7	28.1	32.5
H p D	50	11.3	11.10	13.3	15.0	18.0	24.9
	25	12.8	11.3	14.6	21.0	25.4	28.5
	12.5	12.1	11.2	17.3	25.2	28.9	43.3

【0044】以上のSarcoma-180、B-16

メラノーマを用いた腫瘍形成マウスに対し、AC 800

7物質はPDTにより治療効果が認められ、ヒト肺由来

悪性腫瘍A 549株、ヒト大腸由来悪性腫瘍AZ 521

株、ヒトメラノーマG 361株やヒト子宮頸部由来He

1a細胞などのヒト由来腫瘍に対しても有効であると認

められる。

【0045】(3) 急性毒性

AC 8007物質をマウスに400mg/kg腹腔内投与し

ても死亡例はみられなかった。

(4) マウス急性光毒性実験

光増感剤は生体に取り込まれ、直射日光にあたると光過

敏症を引き起こす。症状は初めヒビの紅斑と痛痒で始ま

り、その後水腫が発生し、数日後腫脹はひくがヒビの壞

死が観察される。重篤な場合、昏睡状態になり死亡する\*

\*例もある。

1) 実験方法

20 I C R (♂、22~25g) マウス(1群3匹)にAC 8007、H p Dをそれぞれについて100mg/kg、50mg/kgとなるように、腹腔内投与を行った。投与直後からマウスの上部からハロゲンランプ(ルミナエース、林時計(株)、J C R 15V、150WB)により2時間(2.5~2.8°C温度条件に維持)照射した。この時、32000ルックスであった。その後普通飼育し、マウス体重と生死を観察した。

2) 実験結果

その結果を表4に示す。

30 【0046】

【表4】

群		死 亡 例			
		例 数	1日目	2日目	3日目
コントロール	照射	3	0	0	0
AC 8007 100 mg/kg (ip) 物質	照射	3	0	0	0
50 mg/kg (ip) 照射		3	0	0	0
H p D	100 mg/kg (ip) 照射	3	3		
	50 mg/kg (ip) 照射	3	1	0	0

【0047】上記の表4に示す通り、AC 8007物質

(100mg/kg、50mg/kg)投与群では死亡例は認め

られなかった。H p D 100mg/kg投与群では全例翌日

までに死亡し、50mg/kg投与群では翌日1/3例の死

亡例が認められた。体重変化については図10に示す通

りであり、AC 8007物質群は無投与照射コントロール群と同じ様に体重の増加が認められた。H p D 50mg/kg投与群で生き残り2/3例の体重変化は翌日、翌々日まで体重減少が認められ、72時間後に回復した。以上のように急性光毒性においてAC 8007物質はH p

17

Dにくらべ高い安全性を認めた。

【0048】以上に述べたように、AC80007物質を、0.1Mトリス塩酸緩衝液を含む生理食塩水(pH7.4)に溶解し、腹腔内投与、静脈内投与、経口投与等により、本物質を投与することにより、腫瘍部位に行き渡つている期間に、光、レーザー、超音波、X線などの照射を行うものである。その結果、悪性腫瘍細胞を壊死にいたらしめ、悪性腫瘍の増殖を抑制することができる。したがつて、本発明の有効物質AC80007物質の投与量としては、1日成人1人当たり1~10mg/kgであり、投与方法としては、無菌緩衝液(pH7.4付近)を加えた生理食塩水に溶解し、静脈内投与、局所投与あるいは経口投与により行う。

【0049】

【発明の効果】本発明は、AC80007物質の光増感・蛍光作用により悪性腫瘍の治療ならびに診断に有効である。

【0050】実施例 1

(1) アースロバクター・エスピード・MT-1 (FERM BPF-3676) を、イオン交換純水1l あたり、イソプロピルアルコール10ml、酵母エキス0.3g、ペプトン3.0g、硝酸アンモニウム3.0g、リン酸カリウム0.4g、リン酸ジナトリウム1.5g、硫酸マグネシウム0.5g、硫酸マンガン1.0mg、硫酸亜鉛1.0mg、硫酸銅50μg、三酸化モリブデン1.0μg、炭酸カルシウム5.0gを含有する殺菌した培地100mlを収容した5.0ml容三角フラスコに種植して、30℃で3日間振とう培養した。この培養物を、上記同様の培地1000mlを含む5000ml容三角フラスコに、1ml植菌して、30℃で5日間振とう培養した。この培養物を5000ml容フラスコ200本を包合せた後、遠心分離によって除菌して培養上清液19lを得た。

【0051】(2) 上記(1)で得た培養上清液を酢酸でpHを2.0に調整後、酢酸エチル81で有効成分を抽出した。この抽出液に水4lを加え、水層のpHをアンモニア水で9.0に調整した後、抽出操作を行つた。分液した水層を約500mlにまで減圧濃縮した。濃縮液を吸着樹脂(ダイヤイオンH-300、三菱化成社製)400mlのカラムに通した。水3lで洗浄後、水3lおよび8.0%アセトント水3lを用いる直線型濃度勾配により溶出を行つた。最初の2lを捨て、その後、1.7gづつの分画を行つと、フラクションNo.87~150に有効成分が溶出された。これらのフラクションを集めて減圧濃縮して暗赤色粉末を得た。

【0052】この粉末を予めブタノール-エタノール-クロロホルム-アノニア水(4:5:2:3)の混合溶媒で充填したシリカゲル(メルク社製、Art 7734、350ml)のカラムにチャージし、上記と同一の混合溶媒で溶出した。最初の600mlを捨て、その後、1.7gづつの分画を行つと、フラクションNo.1~4

50

0に有効成分が溶出された。これらのフラクションを集めて減圧濃縮してAC80007物質の暗赤色粉末を得た。

【0053】(3) 上記(2)で得た暗赤色粉末を、メタノール50%酢酸アンモニウム水溶液(5.5:4.5)の混合溶媒2mlに溶解し、これをオクタデシルシリカゲル(山村化学社製、YMC-GEL-ODS、6.62ml)のカラムにチャージし、前記と同一混合溶媒で溶出した。これを2.0mlづつ分画を行うとフラクションNo.4.2~5.5に有効成分が溶出された。これらのフラクションを集めて減圧下メタノール留去した。残渣を吸着樹脂(三菱化成社製、ダイヤイオンH-20、1.0ml)のカラムに通した。水1lで洗浄後、8.0%アセトント水で溶出した。溶出液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルに溶解した。

【0054】この溶液を1.0mMエチレンジアミントリアセテート水溶液(pH2)で洗浄した後、酢酸エチル層を減圧濃縮した。残渣にヘキサンを加え、析出した沈殿物をガラスフィルター上に集め、減圧乾燥して精製されたAC80007物質(遊離液)を暗赤色粉末として得た。収量1.59mg。

【0055】(4) 上記(3)でAC80007物質(遊離液)1.0mgを4Nアンモニア水1mlに溶解した後、凍結乾燥してAC80007物質のアンモニウム塩を得た。収量1.1mg。

【0056】実施例 2

一群3匹のICRマウス、20g、雄の背部にsarcoma-180 ( $1 \times 10^6$  cells/ml)を0.05ml皮内に接種し、2日後にAC80007物質を腹腔内に投与した。1.0分後にベントバルビタリール麻酔を行い、更にその後、1.0分後にハログランランブ(JCR15V150W)を使用したルミナースル1500s(林時計製)により光照射を10分間、腫瘍部位に熱が伝わらないよう行つた。腫瘍の大きさを3日目から8日目にかけて測定し、表1および表2に示すようなAC80007物質の著名な腫瘍増殖抑制作用が認められた。

【0057】実施例 3

AC80007物質を無菌生理食塩水(pH7.5付近に調整)に5mg/mlとなるよう溶解した。これを0.22μmミリポアフィルターで無菌濾過し、注射剤とした。

【図面の簡単な説明】

【図1】溶媒としてメタノールを用いたときのAC80007物質の可視部吸収スペクトルである。

【図2】溶媒として0.1N HCl・メタノールを用いたときのAC80007物質の可視部吸収スペクトルである。

【図3】AC80007物質の赤外線吸収スペクトルである。

【図4】AC80007物質のプロトン核磁気共鳴スペクトルである。

【図5】AC8007物質の光増感治療効果を示した曲線である。

【図6】AC8007物質の光増感治療効果を示した曲線である。

【図7】AC8007物質の蛍光スペクトルである。

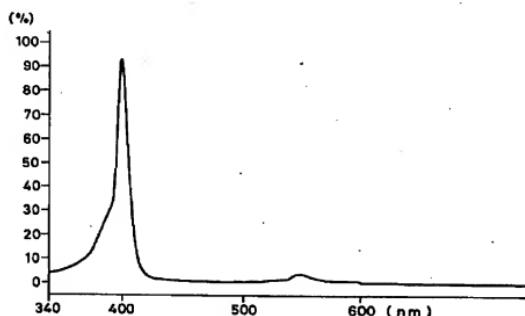
【図8】AC8007物質の光増感治療効果を示した曲

線である。

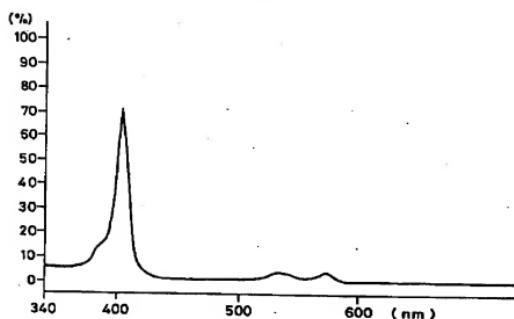
【図9】対照としてのヘマトポルフィリン(HpD)の光増感治療効果を示した曲線である。

【図10】AC8007物質およびヘマトポルフィリン(HpD)のマウス急性光毒性実験における体重変化の曲線である。

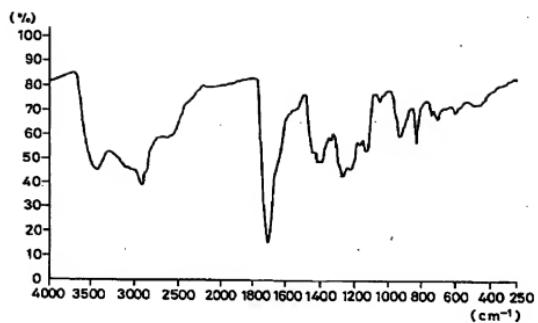
【図1】



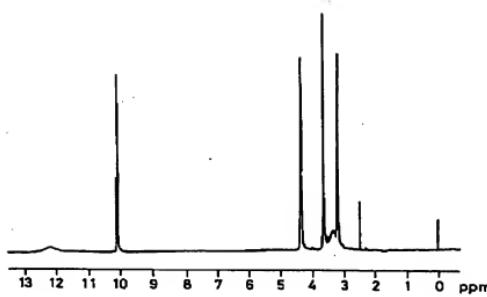
【図2】



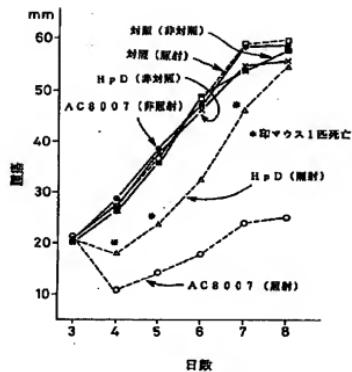
【図3】



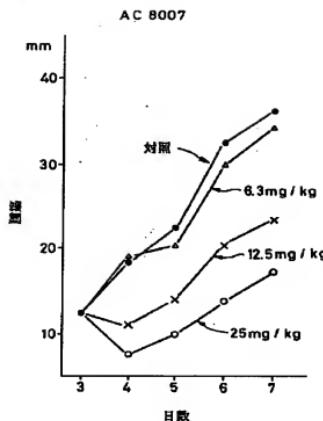
【図4】



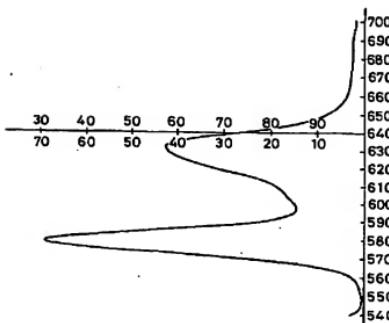
【図5】



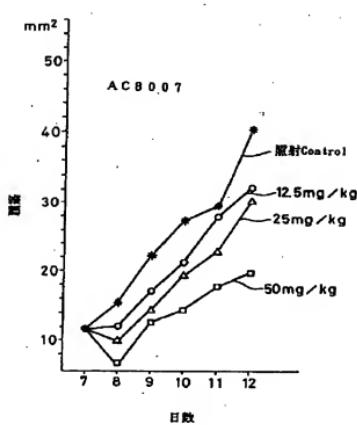
【図6】



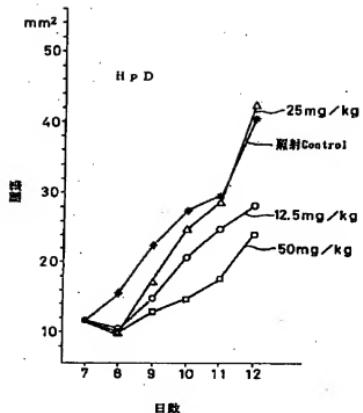
【図7】



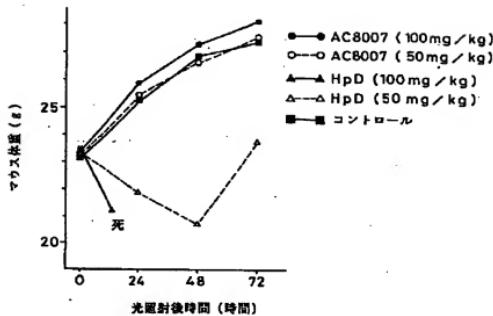
【図8】



[図9]



[図10]



フロントページの続き

(51) Int.Cl.®  
C 12 R 1:06)識別記号 序内整理番号 F I  
7804-4B

技術表示箇所